

PRRSV 河南株 *ORF7* 基因的克隆表达及条件优化

刘 明^{1,2}, 张改平², 肖治军², 郭军庆², 乔松林², 王 丽²,
史西保², 刘运超^{1,2}, 游雷鸣^{1,2}, 王爱萍^{1*}

(1. 郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001; 2. 河南省农业科学院,
农业部动物免疫学重点实验室/ 河南省动物免疫学重点实验室, 河南 郑州 450002)

摘要: 从猪繁殖与呼吸综合症病毒 (PRRSV) 河南分离株 (HN07-1、HN07-2) 的细胞培养物中提取 RNA, 根据参考株 IAF-exp91 N 蛋白 基因序列设计出 2 对引物, 成功克隆出 *ORF7* 全长基因, 并连接至 pMD-19T 载体。基因测序结果表明, 2 株 PRRSV 河南分离株 *ORF7* 基因序列完全相同; 该序列与 HB-4(hs) 同源性为 100%, 与标准美洲株 VR-2332 和我国早期分离的 BJ-4 株同源性为 93.8%。将该基因亚克隆到原核表达载体 pGEX-6p1 后, 转化大肠杆菌 BL21, IPTG 诱导表达并对表达条件进行优化。SDS-PAGE 和 Western blot 结果表明, 成功表达了约 40kD 的融合蛋白; 使用 1.0mmol/L 的 IPTG 在 2×YT 培养基中诱导 8h 可获得最大表达量。

关键词: 猪繁殖与呼吸综合征; 反转录; 克隆; 表达; Western blot; 美洲型

中图分类号: S852.65 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)01-0136-05

Cloning and Prokaryotic Expression of the *ORF7* Gene of PRRSV Henan Strain

LIU Ming^{1,2}, ZHANG Gaiping², XIAO Zhijun², GUO Junqing², QIAO Songlin², WANG Li²,
SHI Xibao², LIU Yunchao^{1,2}, YOU Leiming^{1,2}, WANG Aiping^{1*}
(1. Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China;
2. Key Laboratory of Animal Immunology of the Ministry of Agriculture/ Henan Provincial Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Total RNA was extracted from the cell cultures of two Henan strains of porcine reproductive and respiration syndrome virus (PRRSV), HN07-1 and HN07-2, and the *ORF7* gene of PRRSV was amplified by RT-PCR using specific primers designed according to the sequence of the nucleocapsid protein (N) gene of IAF-exp91. The PCR products were connected into pMD-19T vector, cloned and sequenced. The results showed that the *ORF7* genes of the two strains were same to each other, and the homology of *ORF7* gene with HB-4(hs), VR-2332, and BJ-4 was 100%, 93.8%, and 93.8%, respectively. A prokaryotic expression vector pGEX-6p1 containing *ORF7* gene was constructed, transformed into *E. coli* BL21 and induced with IPTG. SDS PAGE and Western-blot confirmed that the recombinant protein of 40kD was successfully expressed in *E. coli* BL21.

Key words: PRRSV; RT-PCR; Cloning; Expression; Western blot; American genotype

猪繁殖与呼吸综合征(porcine reproductive and respiration syndrome, PRRS) 也称蓝耳病, 是由猪繁殖与呼吸综合征病毒(PRRSV) 引起的以母猪流产和仔猪呼吸障碍为主要特征的病毒性传染病^[1]。该病于 1987 年首次在美国发现, 1991 年荷兰学者 Wensvoort 博士及其同事首次用原代猪肺巨噬细胞分离到 1 株欧洲型 PRRSV, 并命名为 Lelystad virus (LV); 1992 年美国学者 Collins 等分离到 PRRSV 美洲型毒株 ATCC VR-2332, 因此, 国际上将 PRRSV 分为以 ATCC VR-2332 为代表的美洲型和以 LV 为代表的欧洲型^[2]。1996 年, 郭宝清等首次从国内 PRRS 血清阳性猪群中分离到 PRRSV, 证实了我国也有该病的流行^[3]。到目前为止, 我国所分离的毒株多为美洲型 PRRSV。不同 PRRSV 毒株的抗原性或致病性有差异, 用单一毒株制备的疫苗往往不能有效抵抗地方变异株的攻击。因此, 调查研究 PRRSV 地方流行毒株抗原性差异是防控和诊断 PRRS 的关键。

PRRSV 是一种有囊膜的单股、正链、不分节段 RNA 病毒, 属套式病毒目动脉炎病毒科, 基因组长度约 15.1kb, 3' 末端有 Poly(A) 尾序列, 5' 末端有帽状引导序列。基因组含有 9 个相互重叠的开放阅读框(open reading frame, ORF), 从 5' 端到 3' 端依次是: ORF1a、ORF1b、ORF2a、ORF2b 和 ORF3 – ORF7^[4]。

N 蛋白即核衣壳蛋白, 由 ORF7 基因编码, 分子量约为 13.8kD, 北美洲型和欧洲型分离株 N 蛋白分别含有 123 个和 128 个氨基酸^[5]。在该蛋白中至少含有 5 个抗原决定簇, 其中有对所有毒株保守的共同决定簇, 也有美洲型或欧洲型特异性决定簇, 其 C 末端对抗原决定簇的形成至关重要^[6]。本试验克隆了 PRRSV 河南株 ORF7 基因并建立其 N 蛋白的稳定原核表达系统, 旨在为研制新型 PRRSV 疫苗提供基础。

1 材料和方法

1.1 病毒、载体、菌株

PRRSV 河南株 HN07-1 和 HN07-2 的 Marc 145 细胞培养物、大肠杆菌 DH5α、BL21、表达载体 pGEX-6p1 由河南省动物免疫学重点实验室保存; pMD-19T 载体购自大连宝生物工程有限公司。

1.2 主要试剂和工具酶

Trizol RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司; M-MLV 反转录酶、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP、T4 DNA 连接酶、DNA Marker、限制性内切酶 EcoRI

和 Xho I、DNA 切胶回收试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司; 抗标签蛋白 GST 单抗、HRP 标记兔抗鼠 IgG 抗体由河南省动物免疫学重点实验室制备保存; AEC 染色试剂盒购于华美生物公司。

1.3 引物设计与合成

根据参考株 IAF-exp91 N 蛋白基因序列设计合成 2 对克隆引物(表 1), 根据 2 对引物的扩增结果可判断 PRRSV 的基因型, 且 S1R1 可扩增出包含有 ORF7 完整基因的碱基序列^[7]; 用 Primer 软件设计 PRRSV ORF7 基因的特异性表达引物(表 2), 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 PRRSV ORF7 基因克隆引物

名称	序列(5' - 3')
S1	TAAATATGCCAAATAACAAC
R1	TAGGTGACTTAGAGGCACA
S2	ATGGCCAGCCAGTCAATCA
R2	TCGCCCTAATTGAATAGGTG

表 2 PRRSV ORF7 基因特异性表达引物

名称	序列(5' - 3')	剪接酶
Orf7S	GCGGAATTCATGCCAAATAACAACGG	EcoRI
Orf7R	ACCCTCGAGTCATGCTGAGGGTGAAG	XhoI

1.4 ORF7 基因的扩增

用 Trizol RNA 提取试剂盒从 Marc 145 细胞培养物中提取 2 株病毒 RNA, 均用 M-MLV 反转录酶反转录。以反转录后的体系为模板进行 PCR 反应, 反应条件都为: 95℃ 5min; 94℃ 50s, 48℃ 50s, 72℃ 40s, 共 32 个循环; 最后 72℃ 延伸 10min。PCR 产物回收后, 各自连接到 pMD-19T 载体上, 转化 DH5α 感受态细胞, 经 PCR 鉴定后送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 测序结果用 DNAMAN 软件进行分析。

1.5 原核表达质粒的构建

以引物 S1R1 扩增并构建的 pMD-19T-N 重组质粒为模板, 用表 2 中的引物扩增 ORF7 全基因, 反应条件为: 95℃ 4min; 94℃ 40s, 60℃ 40s, 72℃ 30s, 共 32 个循环; 72℃ 延伸 10min。回收目的基因克隆入 pGEX-6p1 载体, 转化感受态大肠杆菌 BL21, 挑取单菌落接种于含氨苄青霉素的液体 LB 培养基中培养。PCR 鉴定后且 XhoI 和 EcoRI 双酶切鉴定均为阳性的菌液送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.6 重组蛋白的原核表达与条件优化

取同一 pGEX-6p1-N 阳性菌分别在添加氨苄青霉素的 LB、2×YT、TB 3 种液体培养基中震荡培养,

至OD₆₀₀达0.6时,加入终浓度为1.0mmol/L的IPTG,在37℃进行诱导表达,于4、8、12、24h收获菌液,用12%凝胶进行SDS-PAGE电泳,确定出最佳的培养基及37℃条件下最佳诱导时间;在最佳诱导时间下以0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mmol/L 5个梯度的IPTG诱导,SDS-PAGE电泳确定出最佳IPTG浓度。

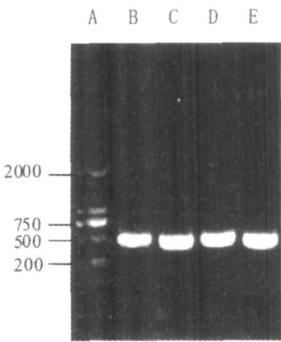
1.7 Western blot 鉴定

将表达融合蛋白的细菌裂解液和空质粒诱导菌液进行SDS-PAGE凝胶电泳分析。然后电转PVDF膜;5%脱脂奶37℃封闭1h,倾去封闭液,PBST洗膜;然后加入以封闭液1000倍稀释的抗GST单抗,37℃反应1h,再用PBST洗膜;加入以封闭液1:1000稀释的HRP标兔抗鼠IgG,37℃反应1h,再用PBST和去离子水洗膜;以AEC染色试剂盒进行染色,出现红色条带立即用去离子水终止显色。

2 结果与分析

2.1 ORF7 基因的扩增与序列测定结果

以病毒RNA反转录后的产物为模板,用表1中的引物进行PCR扩增,结果见图1。产物回收克隆至pMD-19T载体后测序。测序结果表明:2对引物扩增出了长度为468bp和433bp的碱基序列,且468bp序列中包含ORF7全长基因;序列比对发现,2株PRRSV ORF7基因序列完全相同,cDNA编码区长度为372bp,可编码123个氨基酸残基(图2),由此可知,两分离株都是美洲型PRRSV^[6];用DNAMAN软件对序列进行分析,结果可知:该序列与我国变异株HB-4(hs)同源性为100%,与标准美洲株VR-2332和我国早期分离的BJ-4株同源性为93.8%。



A. DNA Marker DL2000; B. S1R1 扩增 HN07-1; C. S2R2 扩增 HN07-1; D. S1R1 扩增 HN07-2; E. S2R2 扩增 HN07-2

图 1 ORF7 基因的扩增结果

1	ATG CCA AAT AAC AAC GGC AAG CAG CAA AAG AAA AAG AAG GGG AAT	45
1	M P N N N G K Q Q K K K G N	15
46	GGC CAG CCA GTC AAT CAG CTG TGC CAA ATG CTG GGT AAG ATC ATC	90
16	G Q P V N Q L C Q M L G K I I	30
91	GCC CAA CAA AAC CAG TCC AGA GGC AAG GGA CCG GGG AAG AAA AAT	135
31	A Q Q N N Q S R G K G P G K K N	45
136	AGG AAG AAA AAC CCG GAG AAG CCC CAT TTC CCT CTA GCG ACT GAA	180
46	R K K N P E K P H F P L A T E	60
181	GAT GAC GTC AGG CAT CAC TTT ACC CCT AGT GAG CGG CAA TTG TGT	225
61	D D V R H N F T P S E R Q L C	75
226	CTG TCG TCG ATC CAG ACT GCC TTC AAT CAG GGC GCT GGA ACT TGT	270
76	L S S I Q T A F N Q G A G T C	90
271	GCC CTG TCA GAT TCA GGG AGG ATA AGT TAC ATC GTG GAG TTT AGT	315
91	A L S D S G R I S Y T V E F S	105
316	TTG CCG ACG CAA CAT ACT GTG CGT CTG ATC CGC GCC ACA GCT TCA	360
106	L P T Q H T V R L I R A T A S	120
361	CCC TCA GCA TGA	372
121	P S A *	

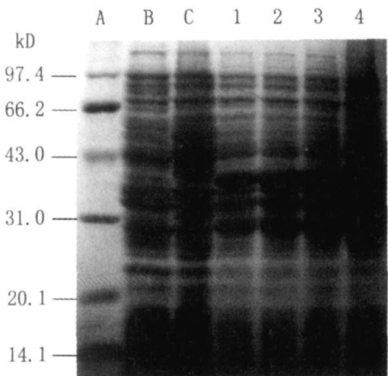
图 2 PRRSV 河南株 HN07-1 和 HN07-2 ORF7 核苷酸序列及推导的氨基酸序列

2.2 重组原核表达质粒的构建和鉴定结果

重组原核表达质粒经PCR和EcoRI + XhoI双酶切鉴定,发现在约372bp处有一特异条带,和预期大小相符。测序结果证实,ORF7基因按正确的读码顺序插入载体。

2.3 重组蛋白的诱导表达、条件优化和 SDS PAGE 分析结果

由图3可见,重组菌pGEX-6p1-N诱导出一条大小约为40kD的蛋白条带,与预期的蛋白分子量一致;重组蛋白的表达量在LB和TB培养基中诱导12h可达到最大,在2×YT培养基中诱导8h即达到最大(图3-图5);对比诱导8h和12h的样品,确定出最佳培养基为2×YT液体培养基(图6);分别用0.5、1.0、1.5、2.0、2.5mmol/L的IPTG在2×YT培养基中37℃诱导8h,确定出最适终浓度为1.0mmol/L(图7)。



A. 蛋白质分子量标准; B. 空质粒诱导; C. 重组质粒未诱导; 1-4. 重组质粒诱导4、8、12、24h

图 3 重组蛋白 LB 液体培养基中表达产物的 SDS - PAGE 检测

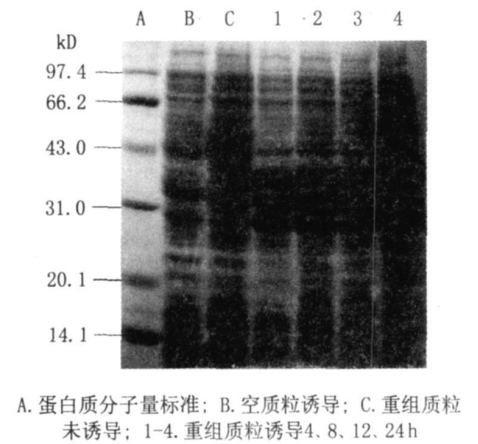


图 4 重组蛋白 2×YT 液体培养基中表达产物的 SDS - PAGE 检测

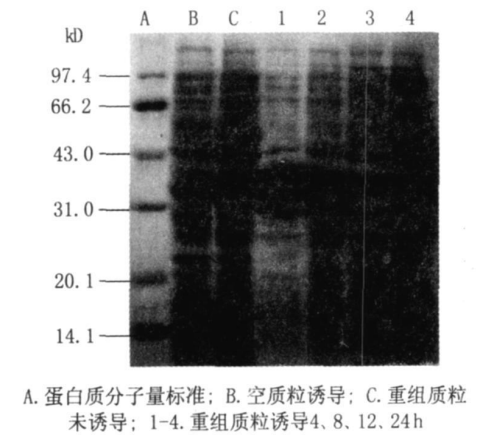


图 5 重组蛋白在 TB 液体培养基中表达产物的 SDS - PAGE 检测

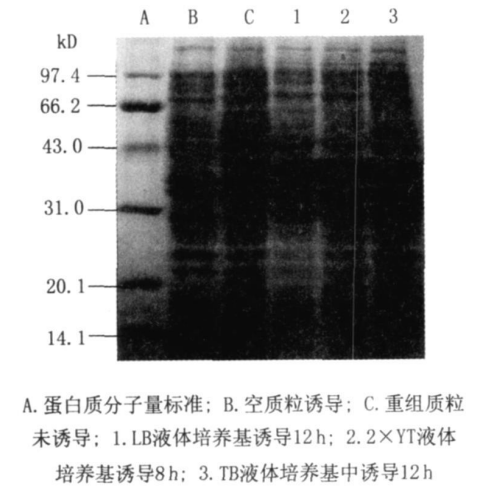


图 6 重组蛋白在 3 种培养基中的最大表达量

2.4 重组蛋白的 Western Blot 鉴定结果
诱导蛋白通过半干式电转仪转印到 PVDF 膜上,与 GST 单克隆抗体发生结合反应,结果重组质粒转化菌在 40kD 处出现 1 条清晰的特异性条带。

空载体转化菌只产生 26kD 的 GST 标签条带,未转化的菌和未诱导的重组菌都未产生目的条带(图 8),结果表明,成功诱导出了融合 N 蛋白。

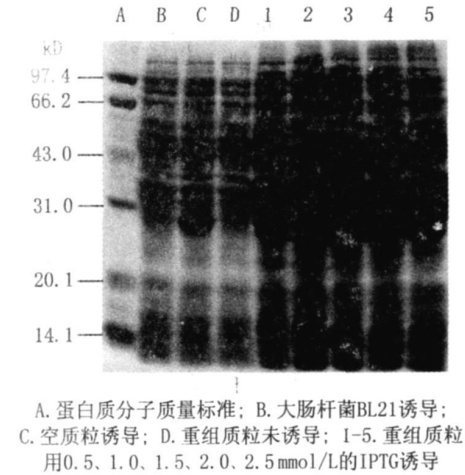


图 7 重组蛋白在 2×YT 培养基中以不同 IPTG 浓度诱导 8h 的表达

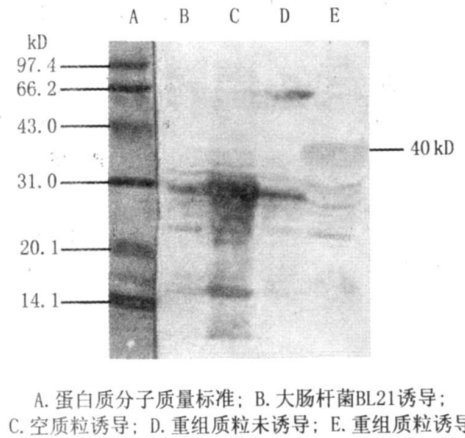


图 8 重组蛋白的 Western - blot 检测

3 讨论

ORF7 基因是 PRRSV 中最保守的片断,克隆此蛋白基因进行表达是目前研究的热点。本试验所用毒株 HN07-1 和 HN7-2 分别分离自豫南和豫北,克隆出了两分离株 PRRSV 的 ORF7 基因,全长均为 372bp,序列完全相同,经判断,两河南株 PRRSV 均属于美洲型^[7],有可能起源于同一流行株 PRRSV。不同 PRRSV 毒株之间 ORF7 基因高度保守,使其在病毒流行过程中承受的选择压力较小,这为设计保守区引物进行 RT-PCR 检测 PRRSV^[8]和人工表达该基因蛋白用作 PRRS 血清学检测提供了依据。
与杆状病毒表达 PRRSV 重组 N 蛋白相比,用大肠杆菌表达系统表达的 PRRSV 重组 N 蛋白易于制备纯化,免疫原性单一,且非特异性低,与病毒

细胞抗原相比,可以克服用全病毒抗原的生产成本高,易散毒等不足。自然感染或疫苗免疫猪均可产生高滴度的抗 N 蛋白抗体且持续时间也最长, N 蛋白是机体免疫应答的主要对象之一,在 PRRSV 主要结构蛋白中免疫原性最强,因此, N 蛋白是目前公认最适作 PRRS 诊断用靶抗原蛋白之一。利用重组 N 蛋白建立了各种 ELISA 诊断方法,有的已投入临床应用,取得了很好的防治效果^[9]。

本试验构建了河南株 PRRSV pGEX-6p1-N 表达系统,并在 37℃进行了蛋白表达和条件优化,为重组蛋白的大量纯化提供了条件。本试验结果亦为下一步研究 N 蛋白的致病或免疫机制和建立快速、敏感、特异、准确的 ELISA 试剂盒奠定了基础。

参考文献:

- [1] 田小辉,王爱萍,乔松林,等.猪繁殖与呼吸障碍综合征病毒 *ORF5* 基因的克隆与表达[J].河南农业科学,2009(2): 103-106.
- [2] Murtaugh M P, Elam M R, Kakach L T. Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus[J]. Arch Viro, 1995, 140(8): 1451-1460.
- [3] 万博,鲍登克,乔松林,等.猪 α 干扰素的表达及在 PAM 细胞系中抗 PRRSV 活性检测[J].河南农业科学,2010(3): 93-99.
- [4] Meulenbergh J J M, Besten A P, Kluyver E P, *et al.* Characterization of proteins encoded by *ORFs* 2 to 7 of Lelystad virus[J]. Virology, 1995, 206: 155-163.
- [5] Plana Duran J, Climent I, Sarraseca J, *et al.* Baculovirus expression of proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain O lot/91. Involvement of *ORF3* and *ORF5* proteins in protection[J]. Virus Genes, 1997, 14: 19-25.
- [6] 刘光清,云涛,王根荣,等.猪生殖与呼吸综合征病毒的基因组及致病的分子基础[J].病毒学报,2007,23(1): 79-83.
- [7] Helmi Mardassi, Louise Wilson, Serge Dea. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between Canadian and European strains by reverse transcription and PCR amplification[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1994, 156: 2197-2203.
- [8] 刘忠华,余兴龙,李润成,等.高致病性猪繁殖与呼吸综合征病 RT-PCR 快速鉴别诊断方法的建立与临床应用[J].微生物学通报,2008,35(8): 1268-1272.
- [9] Denac H, Moser C, Tratsch J D, *et al.* An indirect ELISA for the detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus using recombinant nucleocapsid protein as antigen[J]. J Virol Methods, 1997, 65(2): 169-181.